

2022. gada jūnijs

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit komplekta lietošanas instrukcijas (rokasgrāmata)



50

2. versija



Lietošanai in vitro diagnostikā



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Vācija



1127632LV

Saturs

Paredzētais lietojums	4
Paredzētais lietotājs	4
Apraksts un darbības principi	5
Paraugu tilpumi	5
Paraugu līze	7
QIAamp Mini stobriņa membrānas adsorbcija.....	7
Atlikušo piemaisījumu atdalīšana	7
Attīrīto nukleīnskābju eluēšana	8
Nukleīnskābju iegūtais daudzums un lielums.....	8
Protokolu apraksts	9
Kopsavilkums un skaidrojums	9
Nodrošinātie materiāli.....	10
Komplekta saturs	10
Komplekta komponenti.....	11
Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti.....	12
Papildu reaģenti	12
Palīgmateriāli	12
Aprīkojums	13
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi.....	14
Drošības informācija	14
Ar ārkārtas situācijām saistīta informācija	15
Piesardzības pasākumi	15

Utilizēšana	16
Reaģentu uzglabāšana un lietošana	17
Lietošanas stabilitāte	17
Parauga materiāla uzglabāšana un lietošana.....	18
Procedūra.....	19
Buferšķīdumu un reaģentu sagatavošana	26
Breeze protokols: cirkulējošo nukleīnskābju izdalīšana no 1–5 ml cilvēka asins plazmas.....	29
Klasiskais protokols: cirkulējošo nukleīnskābju izdalīšana no 1–5 ml cilvēka asins plazmas.....	34
Kvalitātes kontrole	39
Ierobežojumi	39
Veiktspējas raksturojums.....	40
Atsauces.....	41
Norādījumi par problēmu novēršanu	42
Simboli.....	45
Pielikums A. Ieteikums asins plazmas atdalīšanai un uzglabāšanai	48
B pielikums. Vispārīgas piezīmes par RNS apstrādi	50
Informācija par pasūtīšanu	51
Dokumenta redakciju vēsture	52

Paredzētais lietojums

QIAamp DSP Circulating NA Kit ir sistēma, kurā izmantota silīcija dioksīda membrānas tehnoloģija (QIAamp tehnoloģija) cirkulējošās starpšūnu DNS un RNS manuālai izolēšanai un izdalīšanai no cilvēka asins plazmas paraugiem.

QIAamp DSP Circulating NA Kit ir paredzēts lietošanai in vitro diagnostikā.

Paredzētais lietotājs

Šo produktu ir paredzēts lietot tikai speciālistiem, piemēram, laborantiem un ārstiem, kuriem ir apmācīti molekulāri bioloģisko metožu izmantošanā.

Apraksts un darbības principi

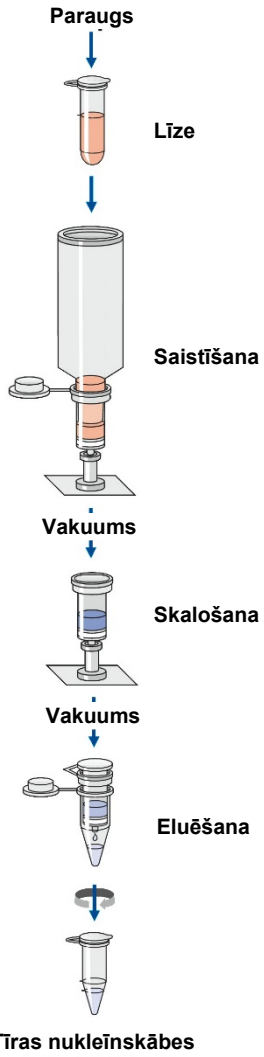
QIAamp DSP Circulating NA procedūra sastāv no 4 posmiem (līze, saistīšana, skalošana un eluēšana), un to veic, izmantojot QIAamp Mini stobriņus QIAvac sistēmā. Drošā procedūra palīdz samazināt krustenisko kontamināciju no parauga uz paraugu un palielina lietotāja drošību, rīkojoties ar potenciāli infekcioziem paraugiem.

Vienkāršā procedūra ir piemērota līdz 24 paraugu vienlaicīgai apstrādei mazāk nekā 2 stundu laikā.

Paraugu tilpumi

QIAamp Mini stobriņi saista fragmentētās nukleīnskābes, kuru garums ir tikai 20 nt, bet iegūtais daudzums ir atkarīgs no parauga tilpuma un paraugā cirkulējošo nukleīnskābju koncentrācijas (parasti 1–100 ng/ml plazmā). QIAamp DSP Circulating NA procedūra ir optimizēta paraugu tilpumiem līdz 5 ml.

**QIAamp DSP Circulating
NA Kit procedūra**



1. attēls. QIAamp DSP Circulating NA Kit procedūras pārskats.

Paraugu līze

Brīvi cirkulējošas nukleīnskābes bioloģiskajos šķīdumos parasti ir saistītas ar proteīniem vai atrodas vezikulu apvalkos, tāpēc ir nepieciešams efektīvs līzes posms, lai nukleīnskābes atbrīvotu selektīvai saistīšanai QIAamp Mini stobriņā. Tāpēc paraugi tiek līzēti īpašas denaturācijas apstākļos paaugstinātā temperatūrā proteīnāzes K un buferšķīduma Buffer ACL klātbūtnē, kas nodrošina DNāzes un RNāzes inaktivāciju un atbrīvo nukleīnskābes no saistītajiem proteīniem, lipīdiem un vezikulām.

QIAamp Mini stobriņa membrānas adsorbcija

Lai nodrošinātu cirkulējošo nukleīnskābju optimālu saistīšanos pie membrānas, tiek pielāgoti saistīšanās apstākļi, lizātam pievienojot buferšķīdumu Buffer ACB. Pēc tam lizāti tiek pārnesti uz QIAamp Mini stobriņu, un cirkulējošās nukleīnskābes no liela tilpuma tiek adsorbētas uz silīcija dioksīda membrānas, kad lizāts tiek sūkts cauri vakuuma spiediena ietekmē. Sāļu un pH līmenis nodrošina, ka lielākā daļa proteīnu un citu piemaisījumu, kas var nomākt PCR un citas pakārtotās fermentatīvās reakcijas, nepaliek uz QIAamp Mini stobriņa membrānas.

Protokola izpildei ir nepieciešams vakuuma kolektors (piem., QIAvac 24 Plus ar QIAvac Connecting System) un vakuuma sūkņis, kas spēj radīt ~800–900 mbar vakuumu (piem., QIAGEN® Vacuum Pump). Lai viegli uzraudzītu vakuuma spiedienu un ērti atbrīvotu vakuumu, jāizmanto ierīce Vacuum Regulator (ietilpst sistēmā QIAvac Connecting System).

Atlikušo piemaisījumu atdalīšana

Nukleīnskābes paliek saistītas ar membrānu, bet piemaisījumi tiek efektīvi aizskaloti 3 skalošanas ciklos.

Attīrīto nukleīnskābju eluēšana

Eluēšanu veic, izmantojot buferšķīdumu Buffer AVE. Viena cikla laikā buferšķīdumā Buffer AVE, kas līdzsvarots līdz istabas temperatūrai, tiek eluētas augstas tīrības cirkulējošās nukleīnskābes. Var pielietot elastīgu eluēšanas tilpumu 50–150 μ l. Ja ir nepieciešama augstāka nukleīnskābes koncentrācija, eluēšanas tilpumu var samazināt pat līdz 20 μ l. Eluēšanas tilpumi, kas mazāki par 50 μ l, var nodrošināt augstākas koncentrācijas nukleīnskābes eluātus, bet var samazināties kopējais iegūtais daudzums.

Atgūtais eluāta tilpums var būt par līdz 5 μ l mazāks nekā eluēšanas buferšķīduma tilpums, kas pielietots stobriņam.

Nukleīnskābju iegūtais daudzums un lielums

Brīvi cirkulējošo nukleīnskābju iegūtais daudzums, kas izolēts no bioloģiskiem paraugiem, parasti ir mazāks par 1 μ g, tāpēc to ir grūti noteikt ar spektrofotometru. Cirkulējošās DNS un RNS absolūtais iegūtais daudzums, kas iegūts no parauga, izmantojot QIAamp DSP Circulating NA Kit atšķiras paraugiem, kas ņemti no dažādiem cilvēkiem, un ir atkarīgs arī no citiem faktoriem (piem., no dažādu slimību stāvokļiem). Turklāt ekstrahētajās nukleīnskābēs esošā RNS nesējvide, vistīcāmāk, dominēs UV absorbcijas rādījumos (skatiet 27. lpp.). Iegūtā daudzuma noteikšanai ieteicams izmantot kvantitatīvās amplifikācijas metodes.

Cirkulējošo nukleīnskābju, kas izdalītas, izmantojot QIAamp DSP circulating NA Kit komplektu, sadalījumu pēc lieluma var pārbaudīt, izmantojot agarozes gela elektroforēzi vai hibridizāciju ar mērķim specifisku marķētu zondi (1) vai ar mikrošķīduma elektroforēzes šķīdumu (piem., Agilent® Bioanalyzer).

Protokolu apraksts

Šajā rokasgrāmatā ir aprakstīti divi dažādi protokoli.

- Protokols “Breeze protokols: cirkulējošo nukleīnskābju izdalīšana no 1–5 ml cilvēka asins plazmas” (29. lpp.) ir paredzēts 5 ml plazmas apstrādei 1 ml posmos un ir optimizēts mazākam roku darbam un apgrozījuma laikiem.
- Protokols “Klasiskais protokols: cirkulējošo nukleīnskābju izdalīšana no 1–5 ml cilvēka asins plazmas” (34. lpp.) ir paredzēts līdz 5 ml plazmas apstrādei 1 ml posmos, un tas ir neizmainīts *QIAamp DSP Circulating NA Kit komplekta rokasgrāmatas* versijas 1 redakcijas 3 (R3) protokols.

Kopsavilkums un skaidrojums

Brīvi cirkulējošas nukleīnskābes parasti ir sastopamas cilvēka plazmā īsu fragmentu veidā — <1000 bp (DNS), <1000 nt (RNS) vai 20 nt (mikroRNS). Brīvi cirkulējošo nukleīnskābju koncentrācija cilvēka asins plazmā parasti ir zema un dažādiem cilvēkiem ievērojami atšķiras, no cilvēkiem iegūtos paraugos svārstoties 1–100 ng/ml diapazonā (2–6).

QIAamp DSP Circulating NA Kit nodrošina iespēju efektīvi izdalīt cirkulējošās nukleīnskābes no cilvēka plazmas. Paraugi var būt gan svaigi, gan sasaldēti. Extension Tubes un vakuuma apstrāde ar QIAvac 24 Plus nodrošina sākuma parauga tilpumu līdz 5 ml, un elastīgi eluēšanas tilpumi 20 līdz 150 µl diapazonā ļauj koncentrēt nukleīnskābju veidus, kas ir klātesoši zemā koncentrācijā.

Eluētās brīvi cirkulējošās DNS vai RNS ir gatavas izmantošanai pakārtotos lietojumos vai piemērotas uzglabāšanai. Lietotājam ir jāveic plazmas ievades un eluēšanas tilpuma optimizēšana sava specifiskā mērķa sasniegšanai un pakārtotajam lietojumam savā laboratorijā.

Nodrošinātie materiāli

Komplekta saturs

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
Kataloga Nr.	61504
Sagatavju skaits	50

	Identifikācija	Simboli	Daudzums
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp Mini stobriņi ar skalošanas stobriņiem) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Stobriņa paplašinātāji) (20 ml)	COL EXT	2 × 25
WT	Wash Tubes (Skalošanas stobriņi) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (Eluēšanas stobriņi) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Vakuuma savienotāji)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer* (Līzes buferšķīdums)	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (Fiksācijas buferšķīdums) (koncentrāts)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (Skalošanas buferšķīdums 1) (koncentrāts)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (Skalošanas buferšķīdums 2) (koncentrāts)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (Eluēšanas buferšķīdums) (violeti vāciņi)	ELU BUF	5 × 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN proteīnāze K)	PROTK	4 × 7 ml
Carrier	Carrier RNA (RNS nesējvidē) (sarkani vāciņi)	CAR RNA	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp Mini stobriņi ar skalošanas stobriņiem) (2 ml)	COL	50
	Rokasgrāmata	H B	1

* Satur haotropo sāli. Skatiet 14. lpp. sadaļu **Brīdinājumi un piesardzības pasākumi**.

† Kā konservantu satur nātrija azīdu.

Komplekta komponenti

Komplekta galvenie komponenti ir izskaidroti tālāk.

1. tabula. Aktīvās sastāvdaļas piegādātajos reaģentos

Reaģents		Aktīvā sastāvdaļa	Koncentrācija
Simbols	Nosaukums		
ACL	Lysis Buffer (Līzes buferšķīdums)	Guanidīna tiocianāts	No ≥ 30 līdz $< 50\%$ w/w
ACB	Binding Buffer (Fiksācijas buferšķīdums) (koncentrāts)	Guanidīna tiocianāts	No ≥ 30 līdz $< 50\%$ w/w
ACW1	Wash Buffer 1 (Skalošanas buferšķīdums 1) (koncentrāts)	Guanidīna hidrohlorīds	No ≥ 30 līdz $< 60\%$ w/w
ACW2	Wash Buffer 2 (Skalošanas buferšķīdums 2) (koncentrāts)	Nav	–
AVE	Elution Buffer (Eluēšanas buferšķīdums) (violeti vāciņi)	Nav	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN proteināze K)	Proteināze K	No ≥ 1 līdz $< 3\%$ w/w
Carrier	Carrier RNA (RNS nesējvide) (sarkani vāciņi)	Nav	–

Kontroles un kalibratori

Lai samazinātu risku rasties negatīvai ietekmei uz diagnostikas rezultātiem, kas ģenerēti pēc nukleīnskābju izolēšanas, ir jāizmanto pakārtotajiem lietojumiem atbilstošas kontroles.

Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti

Papildu reaģenti

- Etanols (96–100%)*
- Izopropanols (100%)
- Sasmaicināts ledus (tikai protokolam “Klasiskais protokols: cirkulējošo nukleīnskābju izdalīšana no 1–5 ml cilvēka asins plazmas”.)
- Dažiem paraugiem var būt nepieciešama atšķaidīšana ar fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu (PBS)

Palīgmateriāli

- Pipetes (pielāgojamas)
- Sterili pipetes uzgaļi (lai palīdzētu novērst krustenisko kontamināciju, ieteicami pipetes uzgaļi ar aerosola barjerām)
- 1,5 vai 2 ml nukleāzi nesaturoši mikrostobriņi
- 50 ml centrifūgas stobriņi

* Neizmantojiet denaturētu spirtu, kas satur papildvielas, piemēram, metanolu vai metiletilketonu.

Aprīkojums

- Ūdens pelde vai sildīšanas bloks, kurā var ievietot 50 ml centrifūgas stobriņus 56 °C vai 60 °C temperatūrā*
- Sildīšanas bloks vai līdzīga ierīce ar 56 °C temperatūru, kurā var ievietot 2 ml skalošanas stobriņus (tikai Klasiskajam protokolam)*
- Virpuļmaisītājs
- Mikrocentrifūga (ar rotoru 2 ml stobriņiem)*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (kat. nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (kat. nr. 19419) vai līdzvērtīga
- Vacuum Pump (kat. nr. 84010 [ASV un Kanāda], 84000 [Japāna] vai 84020 [pārējās valstis]) vai līdzvērtīgs sūknis, kas spēj ražot no –800 līdz –900 mbar vakuumu
- Papildiespēja. VacValves (kat. nr. 19408)

* Nodrošiniet, ka instrumenti tiek pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Ņemiet vērā, ka var būt nepieciešams iepazīties ar vietējiem noteikumiem par ziņošanu ražotājam un reglamentējošai iestādei valstī, kurā atrodas lietotājs un/vai pacients, par nopietniem incidentiem, kas ir radušies saistībā ar ierīci.

Lietošanai in vitro diagnostikā

Drošības informācija

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizlietojamus cimdus un aizsargbrilles. Plašāku informāciju skatiet attiecīgajās drošības datu lapas lapās (Safety Data Sheet, SDS). Tās ir pieejamas tiešsaistē ērtā un kompaktā PDF formātā vietnē www.qiagen.com/safety, kur var meklēt, skatīt un izdrukāt katra QIAGEN komplekta un komplekta komponenta SDS.

BRĪDINĀJUMS Traumu risks cilvēkiem



NEPIEVIENOJĒT balinātāju vai skābus šķīdumus tieši paraugu sagatavošanas atkritumiem.

Buferšķīdumi Buffer ACL, Buffer ACB un Buffer ACW1 satur guanidīna sāļus, kas, kombinējot ar balinātāju, var veidot augstas reaģētspējas savienojumus.

Ja šķīdums, kas satur šos buferšķīdumus, ir izšķīstīts, notīriet to ar piemērotu laboratorijas mazgāšanas līdzekli un ūdeni. Ja izlijušais šķīdums satur potenciāli infekciozas vielas, vispirms notīriet skarto vietu ar laboratorijas mazgāšanas līdzekli un ūdeni un pēc tam ar 1% (v/v) nātrija hipohlorītu.

- Parauga materiāli un paraugi ir potenciāli infekciozi. Utilizējiet paraugus un analīzes atkritumus atbilstoši vietējām drošības procedūrām.

Ar ārkārtas situācijām saistīta informācija

CHEMTREC

ASV un Kanāda 1-800-424-9300

Ārpus ASV un Kanādas +1 703-527-3887

Piesardzības pasākumi

Uz QIAamp DSP Circulating NA Kit sastāvdaļām attiecas tālāk norādītie bīstamības un piesardzības pasākumu paziņojumi.

Buffer ACB



Satur: guanidīna tiocianātu. Bīstami! Kaitīgs, ja norij. Var būt kaitīgs, saskaroties ar ādu vai ieelpojot. Izraisa smagus ādas apdegumus un acu traumas. Kaitīgs ūdens organismiem ar ilgstošām sekām. Saskarē ar skābēm izdalās ļoti toksiska gāze. Izmantot aizsargcimdus / aizsargapģērbu / acu aizsargus / sejas aizsargus. JA IEKĻŪST ACĪS: uzmanīgi izskalo ar ūdeni vairākas minūtes. Izņem kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un ja to ir viegli izdarīt. Turpināt skalot. Nekavējoties sazinieties ar SAINDĒŠANĀS INFORMĀCIJAS CENTRU vai ārstu/ģimenes ārstu.

Buffer ACL



Satur: guanidīna tiocianātu. Bīstami! Kaitīgs, ja norij. Var būt kaitīgs, saskaroties ar ādu vai ieelpojot. Izraisa smagus ādas apdegumus un acu traumas. Kaitīgs ūdens organismiem ar ilgstošām sekām. Saskarē ar skābēm izdalās ļoti toksiska gāze. Izmantot aizsargcimdus / aizsargapģērbu / acu aizsargus / sejas aizsargus. JA IEKĻŪST ACĪS: uzmanīgi izskalo ar ūdeni vairākas minūtes. Izņem kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un ja to ir viegli izdarīt. Turpināt skalot. Nekavējoties sazinieties ar SAINDĒŠANĀS INFORMĀCIJAS CENTRU vai ārstu/ģimenes ārstu.

Buffer ACW1



Satur: guanidīna hidrochlorīdu. Brīdinājums! Kaitīgs, norijot vai ieelpojot. Izraisa ādas kairinājumu. Izraisa nopietnu acu kairinājumu. Izmantot aizsargcimdus / aizsargapģērbu / acu aizsargus / sejas aizsargus. Novilkt piesārņoto apģērbu un izmazgāt pirms atkārtotas lietošanas. Utilizējiet saturu/konteineru, to nododot apstiprinātam atkritumu pārstrādes uzņēmumam.

Proteinase K



Satur: Proteināze K. Bīstami! Izraisa mērenu ādas kairinājumu. Ja ieelpo, var izraisīt alerģiju vai astmas simptomus, vai apgrūtināt elpošanu. Izvairīties ieelpot putekļus / tvaikus / gāzi / dūmus / izgarojumus / smidzinājumu. Izmantot aizsargcimdus / aizsargapģērbu / acu aizsargus / sejas aizsargus. Lietot elpošanas orgānu aizsargierīces. Saskaņā ar gadījuma vai ja ir aizdomas par to: Zvanīt uz SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstam/ģimenes ārstam. Nogādāt cietušo svaigā gaisā un nodrošināt netraucētu elpošanu. Utilizējiet saturu/konteineru, to nododot apstiprinātam atkritumu pārstrādes uzņēmumam.

Utilizēšana

Atkritumi satur paraugus un reaģentus. Šajos atkritumos var būt toksiski vai infekciozi materiāli, un tie ir atbilstoši jāutilizē. Informāciju par atbilstošas utilizēšanas procedūrām skatiet vietējos drošības noteikumos.

Plašāku informāciju skatiet attiecīgajās drošības datu lapas lapās (Safety Data Sheet, SDS). Tās ir pieejamas PDF formātā tiešsaistē vietnē www.qiagen.com/safety, kur var meklēt, skatīt un drukāt SDS katram QIAGEN komplektam un komplekta komponentam.

Reaģentu uzglabāšana un lietošana

QIAamp Mini stobriņi jāuzglabā sausā vietā 2–8 °C temperatūrā. Visi buferšķīdumi jāuzglabā istabas temperatūrā (15–25 °C). QIAamp Mini stobriņus un buferšķīdumus šādos apstākļos bez veikspējas samazinājuma pazīmēm var uzglabāt līdz derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz komplekta kārbas.

Liofilizēta RNS nesējvide jāuzglabā istabas temperatūrā (15–25 °C) līdz derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz komponenta etiķetes. Carrier RNA (RNS nesējvide) jāšķīdina buferšķīdumā Buffer AVE; izšķīdinātā RNS nesējvide nekavējoties jāpievieno buferšķīdumam Buffer ACL, kā aprakstīts 30. lpp sadaļā Breeze Protocol un 35. lpp. sadaļā Klasiskais protokols. Šis šķīdums jā sagatavo svaigs. Buferšķīdumā Buffer AVE izšķīdinātais neizlietotais RNS nesējvides daudzums ir jāsasaldē alikvotās daļās –30 °C līdz –15 °C temperatūrā.

Komplektā QIAamp DSP Circulating NA Kit ietilpst lietošanai gatavs proteināzes K šķīdums, kurš izšķīdināts īpaša sastāva uzglabāšanas buferšķīdumā. Proteināze K ir stabila līdz derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz komponenta marķējuma, ja tiek uzglabāta istabas temperatūrā (15–25 °C).

Lietošanas stabilitāte

Komplektu var izmantot 12 mēnešus pēc pirmās lietošanas reizes vai līdz derīguma termiņa datumam, atkarībā no tā, kurš iestājas agrāk.

Parauga materiāla uzglabāšana un lietošana

Asins uzglabāšana un rīkošanās

Lai izvairītos no starpšūnu nukleīnskābju noārdīšanās un šūnu nukleīnskābju atbrīvošanās, pilnasinis ieteicams uzglabāt ne vairāk kā 6 stundas 2–8 °C temperatūrā (piem., EDTA paraugus). Ja izmantojat stabilizētus asins ņemšanas stobriņus, lūdzu, ievērojiet ražotāja noteiktos uzglabāšanas nosacījumus. Ieteicams pārbaudīt šos uzglabāšanas apstākļus kombinācijā ar jūsu konkrēto pakārtoto lietojumu un mērķi.

Plazmas uzglabāšana un rīkošanās

Ieteicams veikt plazmas atdalīšanu un nukleīnskābes izolēšanu nekavējoties pēc asins savākšanas, ja kā antikoagulants tiek izmantots EDTA, it īpaši RNS iegūšanai. Īslaicīgas uzglabāšanas gadījumā plazmu var uzglabāt līdz 24 stundām 2–8 °C temperatūrā.

Ilgākas uzglabāšanas gadījumā plazmas alikvotās daļas no stabilizētiem vai nestabilizētiem asins parauga ņemšanas stobriņiem var uzglabāt –20 °C vai –80°C temperatūrā līdz 12 mēnešus (tikai tad, ja mērķis ir DNS) vai –80 °C temperatūrā 4 nedēļas (ja mērķis ir RNS).

Eluēto nukleīnskābju uzglabāšana

Eluētās nukleīnskābes tiek savāktas 1,5 ml eluēšanas stobriņos (ietilpst piegādes komplektācijā). Izdalītās cirkulējošās nukleīnskābes var uzglabāt līdz 24 stundas 2–8 °C temperatūrā. Ja uzglabāšanas laiks ir ilgāks par 24 stundām, ieteicamā uzglabāšanas temperatūra ir no –30 °C līdz –15 °C DNS pakārtotajiem lietojumiem un –90 °C līdz –60 °C RNS pakārtotajiem lietojumiem.

Procedūra

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus ir izstrādāts ātrai un efektīvai vakuumpastrādei paralēli līdz 24 QIAGEN centrifūgas stobriņus. Paraugi un skalošanas šķīdumi tiek izsūkti cauri stobriņu membrānām ar vakuumu, nevis ar centrifugēšanu, nodrošinot lielāku ātrumu un mazāk roku darba izdalīšanas procedūrās.

Kombinācijā ar iekārtu QIAvac Connecting System sistēmu QIAvac 24 Plus var izmantot kā caurplūdes sistēmu. Paraugu caurplūde tiek savākta atsevišķā atkritumu pudelē.

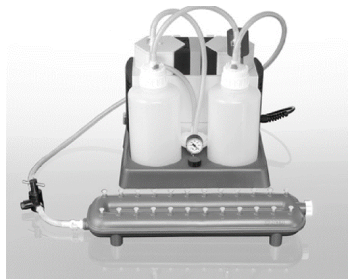
Informāciju par QIAvac 24 Plus apkopi skatiet rīkošanās norādījumos *QIAvac 24 Plus rokasgrāmatā*.

QIAamp Mini stobriņu apstrāde sistēmā QIAvac 24 Plus

QIAamp Mini stobriņus sistēmā QIAvac 24 Plus apstrādā, izmantojot vienreizlietojamus savienotājus VacConnectors un atkārtoti lietojamus vārstus VacValves. Vārstus VacValves (papildiespēja) ievieto tieši QIAvac 24 Plus kolektora Luer tipa slotos un nodrošina pastāvīgu plūsmas ātrumu, kas atvieglo dažāda tilpuma paraugu paralēlu apstrādi. Tie jāizmanto, ja paraugu plūsmas ātrumi ievērojami atšķiras, lai nodrošinātu nemainīgu vakuumu. Savienotāji VacConnectors ir vienreizlietojami savienotāji, ko uzstāda starp QIAamp Mini stobriņiem un vārstiem VacValves vai starp QIAamp Mini stobriņiem un sistēmas QIAvac 24 Plus Luer tipa slotiem. Tie novērš tiešu saskari starp centrifūgas stobriņiem un vārstu VacValve izdalīšanas laikā, tādējādi nepieļaujot krustenisko kontamināciju starp paraugiem. Pēc vienas lietošanas savienotāji VacConnectors jāizmet. Lielu izmantoto šķīduma tilpumu dēļ ir nepieciešama iekārta QIAvac Connecting System (vai līdzīga iekārta ar atkritumu pudelēm) (skatiet 2. attēlu).

Rīkošanās norādījumi darbam ar QIAvac 24 Plus

- Vienmēr novietojiet QIAvac 24 Plus uz nostiprināta darbgalda vai nostiprinātas darba virsmas. Nokrišanas gadījumā QIAvac 24 Plus kolektors var saplīst.
- Vienmēr uzglabājiet QIAvac 24 Plus tīrā un sausā vietā. Informāciju par tīrīšanas procedūrām skatiet *QIAvac 24 Plus rokasgrāmatā*.
- Iekārtas QIAvac 24 Plus komponenti nav izturīgi pret noteiktiem šķīdinātājiem (2. tabula). Ja šie šķīdinātāji tiek izlieti uz iekārtas, rūpīgi noskalojiet to ar ūdeni.
- Lai nodrošinātu nemainīgu veiktspēju, nelietojiet silikona vai vakuuma smērvielas nevienai QIAvac 24 Plus kolektora daļai.
- Strādājot vakuuma kolektora tuvumā, kad tas atrodas zem spiediena, vienmēr ievērojiet piesardzību un valkājiet aizsargbrilles.
- Lai saņemtu informāciju par rezerves vai nomainīgas daļām, sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu vai vietējo izplatītāju.
- Vakuuma spiediens ir spiediena starpība starp spiedienu vakuuma kolektora iekšpusē un atmosfēras spiedienu (standarta atmosfēras spiediens ir 1013 milibāri jeb 760 mm Hg), un to var izmērīt, izmantojot sistēmu QIAvac Connecting System (skatiet 2. attēlu). Protokolu izpildei ir nepieciešams vakuuma sūkņis, kas spēj radīt vakuumu diapazonā no -800 līdz -900 mbar (piem., QIAGEN Vacuum Pump). Augstāks vakuuma spiediens nav pieļaujams. Par ieteikto zemāka vakuuma spiediena izmantošana var samazināt nukleīnskābes iegūto daudzumu un tīrību un palielināt membrānu aizsprostošanās risku.



2. attēls. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System, un Vacuum Pump.

2. tabula. QIAvac 24 Plus ķīmiskās izturības īpašības

Izturīgs pret		Nav izturīgs pret
Etīlskābe	Haotropie sāļi	Benzols
Hromskābe	Koncentrēti spirti	Fenols
SDS	Nātrija hlorīds	Hloroforms
Tween™ 20	Urīnviela	Toluols
Hlorkaļķis	Sālsskābe	Ēteri
Nātrija hidroksīds		

QIAvac 24 Plus vacuum manifold uzstādīšana

1. Savienojiet QIAvac 24 Plus ar vakuuma avotu. Ja izmantojat iekārtu QIAvac Connecting System, savienojiet sistēmu ar kolektoru un vakuuma avotu, kā aprakstīts *QIAvac 24 Plus rokasgrāmatas A* pielikumā.
2. Ievietojiet vārstu VacValve (papildiespēja) katrā QIAvac 24 Plus Luer tipa slotā, ko paredzēts izmantot (skatiet 3. attēlu). Aizveriet neizmantotos Luer tipa slotus ar Luer tipa spraudņiem vai aizveriet ievietoto vārstu VacValve.
Vārsti VacValves jāizmanto, lai nodrošinātu nemainīgu vakuumu, ja paraugu plūsmas ātrumi ievērojami atšķiras.
3. Ievietojiet savienotāju VacConnector katrā vārstā VacValve (skatiet 3. attēlu).
Veiciet šo darbību tieši pirms izdalīšanas sākuma, lai nepakļautu savienotājus VacConnectors gaisā esošo iespējamo piesārņotāju iedarbībai.
4. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņus savienotājos VacConnectors kolektorā (skatiet 3. attēlu).
Piezīme. Saglabājiet blistera iepakojumā esošo skalošanas stobriņu izmantošanai izdalīšanas protokolā.
5. Katrā QIAamp Mini stobriņā ievietojiet stobriņa paplašinātāju (20 ml) (skatiet 3. attēlu).
Piezīme. Stobriņa paplašinātājam ir jābūt cieši ievietotam QIAamp Mini stobriņā, lai nepieļautu parauga noplūdi.

6. Lai veiktu nukleīnskābes izdalīšanu, ievērojiet protokolos sniegtos norādījumus.

Pēc lietošanas pareizi atbrīvojieties no savienotājiem VacConnectors.

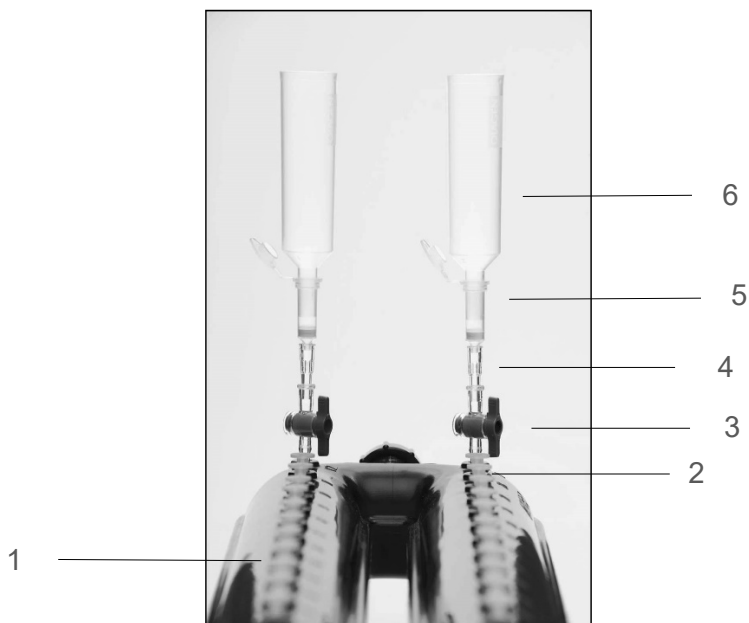
Pielietojot vakuumu, atstājiet QIAamp Mini stobriņa vāciņu atvērtu.

Starp posmiem izslēdziet vakuumu, lai nodrošinātu, ka apstrādes laikā tiek pielietots pastāvīgs, vienmērīgs vakuums. Lai ātrāk iegūtu vakuumu, jāizmanto ierīce Vacuum Regulator (ietilpst iekārtā QIAvac Connecting System).

Piezīme. Katru vārstu VacValve var aizvērt atsevišķi, kad paraugs ir pilnībā izsūkts cauri centrifūgas stobriņam. Tādējādi var paralēli apstrādāt paraugus ar dažādu tilpumu un viskozitāti.

7. Pēc paraugu apstrādes notīriet iekārtu QIAvac 24 Plus (skatiet nodaļu "QIAvac 24 Plus tīrīšana un dekontaminācija" *QIAvac 24 Plus rokasgrāmatā*).

Piezīme. Buferšķīdumi ACL, ACB un ACW1 nav saderīgi ar dezinfekcijas līdzekļiem, kas satur balinātājus. Skatiet 14. lpp. sadaļu Brīdinājumi un piesardzības pasākumi.

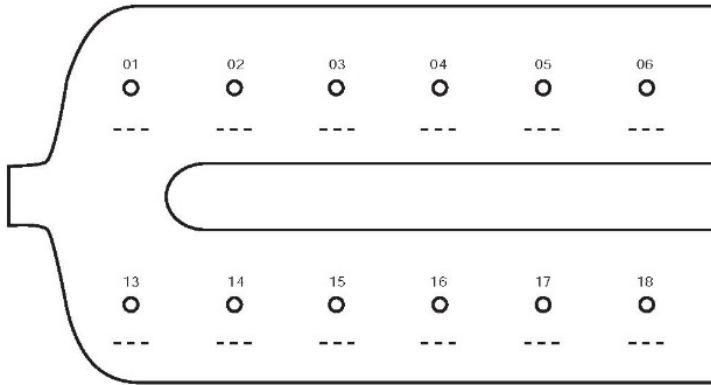


3. attēls. Sistēmas QIAvac 24 Plus aprīkošana ar QIAamp Mini stobriņiem, izmantojot vārstus VacValves, savienotājus VacConnectors un stobriņu paplašinātājus.

- | | | | |
|----------|---|----------|------------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | QIAvac 24 Plus Luer tipa slots (noslēgts ar Luer tipa spraudni) | 5 | QIAamp Mini stobriņš |
| 3 | VacValve* | 6 | Stobriņa paplašinātāji |

Lai izvairītos no paraugu sajaukšanas, ieteicams marķēt stobriņus un QIAamp Mini stobriņus lietošanai QIAvac 24 Plus vakuuma sistēmā atbilstoši shēmai 4. attēlā. Šo attēlu var nokopēt un marķēt ar paraugu nosaukumiem.

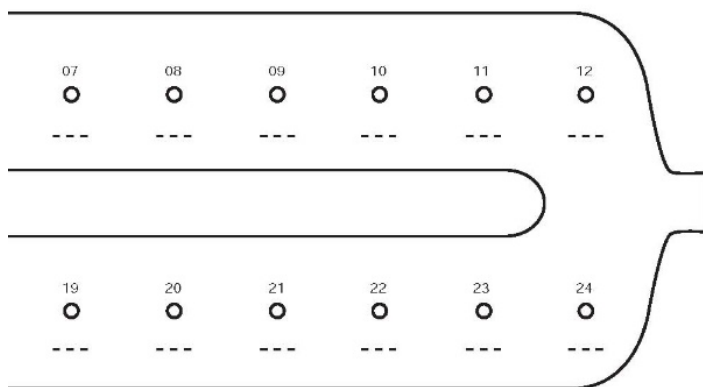
* Jāiegādājas atsevišķi.



Datums: _____

Operators: _____

Sērijas ID: _____



4. attēls. Marķēšanas shēma stobriņiem un QIAamp Mini stobriņiem lietošanai QIAvac 24 Plus vakuuma sistēmā.

Bufeŗķīdumu un reaģentu sagatavoŗana

Buffer ACB

Pirms lietoŗanas pievienojiet 300 ml bufeŗķīduma Buffer ACB koncentrātam 200 ml izopropanola (100%), lai iegūtu 500 ml bufeŗķīduma Buffer ACB. Pēc izopropanola pievienoŗanas rūpīgi samaisiet.

Buffer ACW1*

Pirms lietoŗanas pievienojiet 19 ml bufeŗķīduma Buffer ACW1 koncentrātam 25 ml etanola (96–100%), lai iegūtu 44 ml bufeŗķīduma Buffer ACW1. Pēc etanola pievienoŗanas rūpīgi samaisiet.

Buffer ACW2†

Pirms lietoŗanas pievienojiet 13 ml bufeŗķīduma Buffer ACW2 koncentrātam 30 ml etanola (96–100%), lai iegūtu 43 ml bufeŗķīduma Buffer ACW2. Pēc etanola pievienoŗanas rūpīgi samaisiet.

RNS nesējvides pievienoŗana bufeŗķīdumam Buffer ACL*

RNS nesējvide paredzēta 2 nolūkiem: pirmkārt, tā veicina nukleīnskābju saistīŗanos pie QIAamp Mini membrānas, it īpaŗi, ja paraugā ir ļoti maz mēŗķa molekulu. Otrkārt, liela daudzuma RNS nesējvides pievienoŗana samazina RNS noārdīŗšanās iespēju tādos retos gadījumos, kad nenotiek RNāzes molekulu denaturācija ar haotropiem sāļiem un mazgāŗanas līdzekļiem bufeŗķīdumā Buffer ACL.

* Satur haotropo sāli. Skatiet 14. lpp. sadaļu **Brīdinājumi un piesardzības pasākumi**.

† Kā konservantu satur nātrija azīdu.

Nodrošinātais liofilizētas RNS nesējvides daudzums ir pietiekams komplektā iekļautā buferšķīduma Buffer ACL tilpumam. Ieteicamā RNS nesējvides koncentrācija ir pielāgota tā, lai QIAamp DSP Circulating NA protokolu varētu izmantot kā vispārēju izdalīšanas sistēmu, kas ir saderīga ar daudzām dažādām amplifikācijas sistēmām, un būtu piemērota plašam RNS un DNS mērķu diapazonam.

Amplifikācijas sistēmu efektivitāte atšķiras atkarībā no reakcijā esošā kopējā nukleīnskābju apjoma. Eluāti, kas iegūti no komplekta, satur gan cirkulējošās nukleīnskābes, gan RNS nesējvidi, un vairumā gadījumu RNS nesējvides daudzums ievērojami pārsniegs cirkulējošo nukleīnskābju daudzumu. Tāpēc izolēto cirkulējošo nukleīnskābju daudzuma noteikšana pēc UV absorbcijas rādītāja nebūs atbilstoša, jo šādu mērījumu rezultātus nosaka RNS nesējvides klātbūtne.

Lai iegūtu amplifikācijas reakciju jutīguma augstāko līmeni, var būt nepieciešams samazināt buferšķīdumam Buffer ACL pievienotās RNS nesējvides daudzumu.

Amplifikācijas sistēmās, kurās izmanto oligo dT praimerus, brīvi cirkulējošo nukleīnskābju izolēšanas laikā nav jāpievieno RNS nesējvide.

Pievienojiet 1550 µl Buffer AVE* stobriņā, kurš satur 310 µg liofilizētas RNS nesējvides, lai iegūtu koncentrāciju 0,2 µg/µl. Rūpīgi izšķīdiniet RNS nesējvidi, sadaliet to piemērota lieluma alikvotās daļās un novietojiet glabāšanai no -30 °C līdz -15 °C temperatūrā. RNS nesējvides alikvotās daļas nedrīkst sasaldēt un atkausēt atkārtoti.

Ņemiet vērā, ka RNS nesējvide nešķīst buferšķīdumā Buffer ACL. Tā vispirms jāizšķīdina buferšķīdumā Buffer AVE un pēc tam jāpievieno buferšķīdumam Buffer ACL.

*Kā konservantu satur nātrija azīdu.

Aprēķiniet paraugu partijai nepieciešamā Buffer ACL–RNS nesējvides maisījuma tilpumu atbilstoši protokolos sniegtajām tabulām. Izvēlieties vienlaikus apstrādājamo paraugu skaitu.

Uzmanīgi samaisiet, 10 reizes apgriežot stobriņu vai pudelīti. Lai nepieļautu putošanos, neskaliniet.

Piezīme. Paraugu sagatavošanas procedūra ir optimizēta maksimāli 1,0 µg RNS nesējvidei uz paraugu. Ja ir noskaidrots, ka jūsu amplifikācijas sistēmai labāk piemērots mazāks RNS nesējvides daudzums, pārnesiet uz stobriņiem, kas satur buferšķīdumu Buffer ACL, tikai nepieciešamo RNS nesējvides daudzumu. Uz katru sagatavotajā šķīdumā nepieciešamās RNS nesējvides mikrogramu pievienojiet buferšķīdumam Buffer ACL 5 µl izšķīdinātas RNS nesējvides. (Var būt izdevīgi izmantot mazāk nekā 1,0 µg RNS nesējvides uz paraugu, un tas ir jāpārbauda katram konkrētam parauga tipam un pakārtotajai analīzei.)

Breeze protokols: cirkulējošo nukleīnskābju izdalīšana no 1–5 ml cilvēka asins plazmas

Šis protokols ir paredzēts cirkulējošo DNS un RNS izdalīšanai no 1–5 ml cilvēka asins plazmas un ir optimizēts, samazinot roku darbu un izpildes laiku. Esošās lietotāju apstiprinātās darbplūsmas, izmantojot QIAamp DSP Circulating NA Kit versiju 1/R3, lūdzu, skatiet sadaļā “Klasiskais protokols: cirkulējošo nukleīnskābju izdalīšana no 1–5 ml cilvēka asins plazmas” (34. lpp.).

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Visi centrifugēšanas posmi tiek veikti istabas temperatūrā (15–25 °C).
- Starp posmiem izslēdziet vakuumu, lai nodrošinātu, ka protokola posmu laikā tiek pielietots pastāvīgs, vienmērīgs vakuums.
Piezīme. Vacuum Pump spiedienam jābūt no –800 līdz –900 mbar.
- Līdzsvaroiet paraugus līdz istabas temperatūrai.
- Izmantojiet PBS, lai sasniegtu tuvāko precīzo parauga tilpumu (no 1 līdz 5 ml).
- Sagatavojiet QIAvac 24 Plus, kā aprakstīts 21. lpp.
- Uzsildiet ūdens peldi vai sildīšanas bloku līdz 56 °C lietošanai ar 50 ml centrifūgas stobriņiem 3. posmā.
- Pirms lietošanas līdzsvaroiet QIAamp Mini centrifūgas stobriņus vismaz 1 stundu līdz istabas temperatūrai.
- Pārliecinieties, ka ir sagatavoti buferšķīdumi Buffer ACB, Buffer ACW1 un Buffer ACW2 (izopropanola vai etanola pievienošana) atbilstoši norādījumiem 26. lpp.
- Pievienojiet buferšķīdumā Buffer AVE izšķīdinātu RNS nesējvidi buferšķīdumam Buffer ACL atbilstoši norādījumiem 3. tabulā.

3. tabula. Buferšķiduma Buffer ACL un RNS nesējvides (izšķīdināta buferšķidumā Buffer AVE) tilpums, kas nepieciešams 1–5 ml cilvēka asins plazmas paraugu apstrādei

Iestatīšana ml plazmas	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Paraugu skaits	Buffer ACL (ml)					RNS nesējvide buferšķidumā Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procedūra: Breeze protokols

1. Pipetējiet QIAGEN Proteinase K, plazmu un buferšķīdumu Buffer ACL **šādā secībā** 50 ml centrifūgas stobriņā (neietilpst komplektācijā).

Iestatīšana	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plazma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Aizveriet vāciņu un samaisiet, 5 x 2 s ar pārtraukumiem saskalinot.

Pārliecinieties, ka stobriņā veidojas saskatāms virpulis. Lai nodrošinātu efektīvu līzi, ir svarīgi paraugu un buferšķīdumu Buffer ACL kārtīgi samaisīt, iegūstot viendabīgu šķīdumu.

Piezīme. Šajā brīdī nepārtrauciet procedūru. Nekavējoties turpiniet ar 3. posmu, lai sāktu līzes inkubāciju.

3. Inkubējiet 56 °C (± 1 °C) temperatūrā 15 (± 1) min.
4. Novietojiet stobriņu atpakaļ uz laboratorijas galda un noskrūvējiet vāciņu.
5. Stobriņā esošajam lizātam pievienojiet Buffer ACB. Izvēlieties tilpumu atbilstoši iestatīšanai 1. posmā.

Iestatīšana	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Aizveriet vāciņu un rūpīgi samaisiet, 5 x 2 s ar pārtraukumiem saskalinot.

Pārliecinieties, ka stobriņā veidojas saskatāms virpulis. Lai nodrošinātu efektīvu līzi, ir svarīgi lizātu un buferšķīdumu Buffer ACB kārtīgi samaisīt, iegūstot viendabīgu šķīdumu.

7. Inkubējiet lizāta–Buffer ACB maisījumu stobriņā 5 (± 1) min istabas temperatūrā.

8. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņus savienotājos VacConnector iekārtā QIAvac 24 Plus (skatiet “QIAvac 24 Plus vacuum manifold uzstādīšana”, 21. lpp.). Ievietojiet 20 ml stobriņa paplašinātāju atvērtā QIAamp Mini stobriņā.

Stobriņa paplašinātājam ir jābūt cieši ievietotam QIAamp Mini stobriņā, lai nepieļautu parauga noplūdi.

Piezīme. Sagatavojiet skalošanas stobriņu sausajai centrifugēšanai 13. posmā.

9. Uzmanīgi pielietojiet lizātu no 7. posma stobriņa paplašinātājā, kas atrodas QIAamp Mini stobriņā. Ieslēdziet vakuuma sūkni. Kad visi lizāti ir pilnībā izsūkti cauri stobriņiem, izslēdziet vakuuma sūkni un samaziniet spiedienu līdz 0 mbar. Uzmanīgi izņemiet un izmetiet stobriņa paplašinātāju.

Lūdzu, ņemiet vērā, ka lieliem parauga lizāta tilpumiem (aptuveni 18 ml, ja sākts ar 5 ml paraugu) var būt nepieciešamas maksimāli 20 min, lai ar vakuuma spēku šķērsotu QIAamp Mini membrānu.

Lai ātri un ērti atbrīvotu vakuuma spiedienu, jāizmanto ierīce Vacuum Regulator (ietilpst iekārtā QIAvac Connecting System).

Piezīme. Lai nepieļautu krustenisko kontamināciju, ievērojiet piesardzību un nešķērsojiet blakus esošos QIAamp Mini stobriņus stobriņu paplašinātāju izņemšanas laikā.

10. Pievienojiet 600 µl Buffer ACW1 QIAamp Mini stobriņam. Atstājiet stobriņa vāciņu atvērtu un ieslēdziet vakuuma sūkni. Kad viss buferšķīdums Buffer ACW1 ir pilnībā izsūkts cauri QIAamp Mini stobriņam, izslēdziet vakuuma sūkni un samaziniet spiedienu līdz 0 mbar.
11. Pievienojiet 750 µl Buffer ACW2 QIAamp Mini stobriņam. Atstājiet stobriņa vāciņu atvērtu un ieslēdziet vakuuma sūkni. Kad viss buferšķīdums Buffer ACW2 ir pilnībā izsūkts cauri QIAamp Mini stobriņam, izslēdziet vakuuma sūkni un samaziniet spiedienu līdz 0 mbar.
12. Pievienojiet 750 µl etanola (96–100%) QIAamp Mini stobriņam. Atstājiet stobriņa vāciņu atvērtu un ieslēdziet vakuuma sūkni. Kad viss etanols ir pilnībā izsūkts cauri centrifūgas stobriņam, izslēdziet vakuuma sūkni un samaziniet spiedienu līdz 0 mbar.

13. Aizveriet QIAamp Mini stobriņa vāciņu. Izņemiet stobriņu no vakuuma kolektora un izmetiet savienotāju VacConnector. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņu tīrā 2 ml skalošanas stobriņā (no 8. posma) un centrifugējiet pilnā ātrumā (20 000 x g; 14 000 apgr./min) 3 (±0,5) min.
14. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņu jaunā 2 ml skalošanas stobriņā. Atveriet vāciņu un inkubējiet bloku istabas temperatūrā 3 min, lai pilnībā nožāvētu membrānu.
15. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņu tīrā 1,5 ml eluēšanas stobriņā (ietilpst komplektācijā) un izmetiet 2 ml skalošanas stobriņu, ko izmantojāt 14. posmā. Uzmanīgi pievienojiet 20–150 µl buferšķīduma Buffer AVE QIAamp Mini stobriņa membrānas centrā. Aizveriet vāciņu un inkubējiet istabas temperatūrā 3 (±0,5) min.

Svarīgi! Pārliedzieties, vai buferšķīdums Buffer AVE ir līdzsvarots līdz istabas temperatūrai (15–25 °C). Ja eluēšana tiek veikta maziem tilpumiem (<50 µl), lai pilnībā eluētu saistītās nukleīnskābes, eluēšanas buferšķīdums jādozē membrānas centrā.

Eluēšanas tilpums ir mainīgs un var tikt pielāgots atbilstoši pakārtoto lietojumu vajadzībām.

Eluēšana ar mazākiem Buffer AVE tilpumiem var nodrošināt augstāku nukleīnskābes koncentrāciju, bet var samazināties kopējais iegūtais daudzums.

Atgūtais eluāta tilpums var būt par 5 µl mazāks nekā eluēšanas tilpums, kas pielietots QIAamp Mini stobriņa membrānai.

Piezīme. Ja paredzams zems NA iegūtais daudzums, eluēšanai ieteicams izmantot zemas saistīšanas stobriņu (neietilpst komplektācijā).

16. Centrifugējiet mikrocentrifūgā pilnā ātrumā (20 000 x g; 14 000 apgr./min) 1 min, lai eluētu nukleīnskābes.

Piezīme. Pavērsiet eluēšanas stobriņu vāciņus tā, ka tie ir vērsti rotora rotācijai pretējā virzienā (piem., ja rotors griežas pulksteņrādītāju virzienā, pavērsiet vāciņus pretēji pulksteņrādītāju virzienam).

Klasiskais protokols: cirkulējošo nukleīnskābju izdalīšana no 1–5 ml cilvēka asins plazmas

Šis protokols ir nemainīts *QIAamp DSP Circulating NA Kit rokasgrāmatas* redakcijas 3 (R3) protokols izmantošanai ar, piemēram, pastāvošajām lietotāju apstiprinātajām darbplūsmām 1–5 ml cilvēka plazmai.

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Visi centrifugēšanas posmi tiek veikti istabas temperatūrā (15–25 °C).
- Starp posmiem izslēdziet vakuumu, lai nodrošinātu, ka protokola posmu laikā tiek pielietots pastāvīgs, vienmērīgs vakuums.
Piezīme. Vacuum Pump spiedienam jābūt no –800 līdz –900 mbar.
- Līdzsvaroiet paraugus līdz istabas temperatūrai.
- Izmantojiet PBS, lai sasniegtu tuvāko precīzo parauga tilpumu (no 1 līdz 5 ml).
- Sagatavojiet QIAvac 24 Plus, kā aprakstīts 21. lpp.
- Uzsildiet ūdens peldi vai sildīšanas bloku līdz 60°C lietošanai ar 50 ml centrifūgas stobriņiem 3. posmā.
- Uzsildiet sildīšanas bloku līdz 56 °C lietošanai ar 2 ml skalošanas stobriņiem 14. posmā.
- Pirms lietošanas līdzsvaroiet QIAamp Mini centrifūgas stobriņus vismaz 1 stundu līdz istabas temperatūrai.
- Pārliecinieties, ka ir sagatavoti buferšķīdumi Buffer ACB, Buffer ACW1 un Buffer ACW2 (izopropanola vai etanola pievienošana) atbilstoši norādījumiem 26. lpp.
- Pievienojiet buferšķīdumā Buffer AVE izšķīdinātu RNS nesējvidi buferšķīdumam Buffer ACL atbilstoši norādījumiem 4. tabulā.

4. tabula. Buferšķiduma Buffer ACL un RNS nesējvides (izšķīdināta buferšķidumā Buffer AVE) tilpums, kas nepieciešams 1–5 ml cilvēka asins plazmas paraugu apstrādei

Iestatīšana ml plazmas	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Paraugu skaits	Buffer ACL (ml)					RNS nesējvide buferšķidumā Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procedūra: Klasiskais protokols

1. Pipetējiet QIAGEN Proteinase K, plazmu un buferšķīdumu Buffer ACL šādā secībā 50 ml centrifūgas stobriņā (neietilpst komplektācijā).

Iestatīšana	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plazma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Aizveriet vāciņu un samaisiet, 30 s ar pārtraukumiem saskalinot.

Pārliecinieties, ka stobriņā veidojas saskatāms virpulis. Lai nodrošinātu efektīvu līzi, ir svarīgi paraugu un buferšķīdumu Buffer ACL kārtīgi samaisīt, iegūstot viendabīgu šķīdumu.

Piezīme. Šajā brīdī nepārtrauciet procedūru. Nekavējoties turpiniet ar 3. posmu, lai sāktu līzes inkubāciju.

3. Inkubējiet 60 °C (± 1 °C) temperatūrā 30 (± 2) min.
4. Novietojiet stobriņu atpakaļ uz laboratorijas galda un noskrūvējiet vāciņu.
5. Stobriņā esošajam lizātam pievienojiet Buffer ACB. Izvēlieties tilpumu atbilstoši iestatīšanai 1. posmā.

Iestatīšana	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Aizveriet vāciņu un rūpīgi samaisiet, 30 s ar pārtraukumiem saskalinot.

Pārliecinieties, ka stobriņā veidojas saskatāms virpulis. Lai nodrošinātu efektīvu līzi, ir svarīgi lizātu un buferšķīdumu Buffer ACB kārtīgi samaisīt, iegūstot viendabīgu šķīdumu.

7. Inkubējiet lizāta–Buffer ACB maisījumu stobriņā 5 (± 1) min uz ledus.

8. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņus savienotājos VacConnector iekārtā QIAvac 24 Plus (skatiet “QIAvac 24 Plus vacuum manifold uzstādīšana”, 21. lpp.). Ievietojiet 20 ml stobriņa paplašinātāju atvērtā QIAamp Mini stobriņā.

Stobriņa paplašinātājam ir jābūt cieši ievietotam QIAamp Mini stobriņā, lai nepieļautu parauga noplūdi.

Piezīme. Sagatavojiet skalošanas stobriņu sausajai centrifugēšanai 13. posmā.

9. Uzmanīgi pielietojiet lizātu no 7. posma stobriņa paplašinātājā, kas atrodas QIAamp Mini stobriņā. Ieslēdziet vakuuma sūkni, pielietojot –800 līdz –900 mbar spiedienu. Kad visi lizāti ir pilnībā izsūkti cauri stobriņiem, izslēdziet vakuuma sūkni un samaziniet spiedienu līdz 0 mbar. Uzmanīgi izņemiet un izmetiet stobriņa paplašinātāju.

Lūdzu, ņemiet vērā, ka lieliem parauga lizāta tilpumiem (aptuveni 18 ml, ja sākts ar 5 ml paraugu) var būt nepieciešamas maksimāli 20 min, lai ar vakuuma spēku šķērsotu QIAamp Mini membrānu.

Lai ātri un ērti atbrīvotu vakuuma spiedienu, jāizmanto ierīce Vacuum Regulator (ietilpst iekārtā QIAvac Connecting System).

Piezīme. Lai nepieļautu krustenisko kontamināciju, ievērojiet piesardzību un nešķērsojiet blakus esošos QIAamp Mini stobriņus stobriņu paplašinātāju izņemšanas laikā.

10. Pievienojiet 600 µl Buffer ACW1 QIAamp Mini stobriņam. Atstājiet stobriņa vāciņu atvērtu un ieslēdziet vakuuma sūkni. Kad viss buferšķīdums Buffer ACW1 ir pilnībā izsūkts cauri QIAamp Mini stobriņam, izslēdziet vakuuma sūkni un samaziniet spiedienu līdz 0 mbar.
11. Pievienojiet 750 µl Buffer ACW2 QIAamp Mini stobriņam. Atstājiet stobriņa vāciņu atvērtu un ieslēdziet vakuuma sūkni. Kad viss buferšķīdums Buffer ACW2 ir pilnībā izsūkts cauri QIAamp Mini stobriņam, izslēdziet vakuuma sūkni un samaziniet spiedienu līdz 0 mbar.
12. Pievienojiet 750 µl etanola (96–100%) QIAamp Mini stobriņam. Atstājiet stobriņa vāciņu atvērtu un ieslēdziet vakuuma sūkni. Kad viss etanols ir pilnībā izsūkts cauri centrifūgas stobriņam, izslēdziet vakuuma sūkni un samaziniet spiedienu līdz 0 mbar.

13. Aizveriet QIAamp Mini stobriņa vāciņu. Izņemiet stobriņu no vakuuma kolektora un izmetiet savienotāju VacConnector. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņu tīrā 2 ml skalošanas stobriņā (no 8. posma) un centrifugējiet pilnā ātrumā (20 000 x g; 14 000 apgr./min) 3 (±0,5) min.
14. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņu jaunā 2 ml skalošanas stobriņā. Atveriet vāciņu un inkubējiet bloku 56 °C(±1 °C) temperatūrā 10 (±1) min, lai pilnībā nožāvētu membrānu.
15. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņu tīrā 1,5 ml eluēšanas stobriņā (ietilpst komplektācijā) un izmetiet 2 ml skalošanas stobriņu, ko izmantojāt 13. posmā. Uzmanīgi pievienojiet 20–150 µl buferšķīduma Buffer AVE QIAamp Mini stobriņa membrānas centrā. Aizveriet vāciņu un inkubējiet istabas temperatūrā 3 (±0,5) min.

Svarīgi! Pārliedzinieties, vai buferšķīdums Buffer AVE ir līdzsvarots līdz istabas temperatūrai (15–25 °C). Ja eluēšana tiek veikta maziem tilpumiem (<50 µl), lai pilnībā eluētu saistītās nukleīnskābes, eluēšanas buferšķīdums jādozē membrānas centrā.

Eluēšanas tilpums ir mainīgs un var tikt pielāgots atbilstoši pakārtoto lietojumu vajadzībām.

Eluēšana ar mazākiem Buffer AVE tilpumiem var nodrošināt augstāku nukleīnskābes koncentrāciju, bet var samazināties kopējais iegūtais daudzums.

Atgūtais eluāta tilpums var būt par 5 µl mazāks nekā eluēšanas tilpums, kas pielietots QIAamp Mini stobriņam.

Piezīme. Ja paredzams zems NA iegūtais daudzums, eluēšanai ieteicams izmantot zemas saistīšanas stobriņu (neietilpst komplektācijā).

16. Centrifugējiet mikrocentrifūgā pilnā ātrumā (20 000 x g; 14 000 apgr./min) 1 min, lai eluētu nukleīnskābes.

Piezīme. Pavērsiet eluēšanas stobriņu vāciņus tā, ka tie ir vērsti rotora rotācijai pretējā virzienā (piem., ja rotors griežas pulksteņrādītāju virzienā, pavērsiet vāciņus pretēji pulksteņrādītāju virzienam).

Kvalitātes kontrole

Atbilstoši ISO prasībām sertificētajai QIAGEN kvalitātes vadības sistēmai katra QIAamp DSP Circulating NA Kit partija ir pārbaudīta, salīdzinot ar iepriekš noteiktām specifikācijām, lai nodrošinātu pastāvīgu produkta kvalitāti.

Ierobežojumi

Sistēmas veiktspēja cirkulējošo starpšūnu nukleīnskābju izolēšanā ir noteikta, izmantojot cilvēka plazmas paraugus, kas iegūti no tālāk norādītajiem asins ņemšanas stobriņiem:

- K2-EDTA (Beckton Dickinson and Company, kat. nr. 367525)
- PAXgene® Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, kat. nr. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, kat. nr. 218962)

Lietotāja pienākums ir pārbaudīt sistēmas veiktspēju attiecībā uz visām viņu laboratorijā izmantotajām procedūrām, kas nav ietvertas QIAGEN veiktspējas pētījumos.

Lai samazinātu negatīvas ietekmes uz diagnostikas rezultātiem risku, pakārtotiem lietojumiem ir jāizmanto atbilstoši kontrolmateriāli. Lai iegūtu papildu informāciju par validāciju, ieteicams skatīt Starptautiskās konferences par tehnisko prasību saskaņošanu (International Conference on Harmonization, ICH) sagatavotās vadlīnijas ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Test And Methodology.

Visi iegūtie diagnostikas rezultāti jāinterpretē kopā ar citiem klīniskām vai laboratoriskām atradnēm.

Veiktspējas raksturojums

Attiecināmais veiktspējas raksturojums ir atrodams produkta lapas resursu cilnē, vietnē www.qiagen.com.

Atsauces

1. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. *Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Humana Press.
3. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. **56**, 1210-1211.
4. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 541-563.
5. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* **10**, 21.
6. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. **57**, 932-953.

Norādījumi par problēmu novēršanu

Šie norādījumi par problēmu novēršanu var palīdzēt atrisināt radušās problēmas. Vairāk informācijas skatiet arī lapā “Biežāk uzdotie jautājumi” (Frequently Asked Questions, FAQ), kas pieejama mūsu tehniskā atbalsta centra vietnē: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN tehniskā atbalsta dienesta zinātnieki vienmēr labprāt atbildēs uz jūsu jautājumiem gan par informāciju un/vai protokoliem šajā rokasgrāmatā, gan arī par paraugu un analīzes metodēm (kontaktinformāciju skatiet vietnē www.qiagen.com).

Komentāri un ieteikumi

Eluātā ir ļoti maz vai nav nukleīnskābju

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Nestabilizētas plazmas lietošana | Nestabilizētas plazmas paraugi var izraisīt paātrinātu DNS noārdīšanos. Mēs iesakām ievērot CEN/TS 16835-3:2015. Atkārtojiet izdalīšanas procedūru ar jauniem paraugiem. |
| b) | Palielināts laiks starp asins ņemšanu un plazmas sagatavošanu | Kodolotas asins šūnas var sadalīties un atbrīvot plazmā genoma DNS, atšķaidot mērķa nukleīnskābi. |
| c) | Paraugi ir sasaldēti un atkausēti vairāk nekā vienu reizi. | Jāizvairās no vairākkārtējas paraugu sasaldēšanas un atkausēšanas, jo tas var izraisīt DNS noārdīšanos. Vienmēr izmantojiet svaigus paraugus vai paraugus, kuri ir atkausēti tikai vienu reizi. |
| d) | Zema mērķa DNS koncentrācija paraugos | Plazmas paraugi ir pārāk ilgi atstāti istabas temperatūrā. Atkārtojiet izdalīšanas procedūru ar jauniem paraugiem
Piezīme. Dažiem cilvēkiem plazmā var būt zema šūnas nesaturošu nukleīnskābju (NA) koncentrācija; tādā gadījumā jāizvēlas palielināts parauga tilpums un zems eluāta tilpums. |
| e) | Neefektīva parauga līze buferšķīdumā Buffer ACL | Ja komponents QIAGEN Proteinase K ilgāku laiku tiek pakļauts paaugstinātas temperatūras iedarbībai, tas var zaudēt aktivitāti. Atkārtojiet procedūru, izmantojot jaunu paraugu un svaigu QIAGEN Proteinase K. |
| f) | Buffer ACL–RNS nesējvides maisījums nav pietiekami samaisīts | Samaisiet buferšķīdumu Buffer ACL ar RNS nesējvidi, uzmanīgi apgriežot Buffer ACL–RNS nesējvides stobriņu vismaz 10 reizes. |
| g) | Lietots etanols ar zemu procentuālo vērtību, nevis 96–100% | Atkārtojiet izdalīšanas procedūru ar jauniem paraugiem un 96–100% etanolu. Neizmantojiet denaturētu spirtu, kas satur papildvielas, piemēram, metanolu vai metilētilketonu. |
| h) | Buferšķīdums Buffer ACB nav pareizi sagatavots | Pārbaudiet, vai buferšķīduma Buffer ACB koncentrāts ir atšķaidīts ar pareizu izopropanola tilpumu (nevis ar etanolu; skatiet 26. lpp.). |
| i) | Buferšķīdums Buffer ACW1 vai Buffer ACW2 nav pareizi sagatavots | Pārbaudiet, vai buferšķīdumu Buffer ACW1 un Buffer ACW2 koncentrāti ir atšķaidīti ar pareizu etanola tilpumu (skatiet 26. lpp.). Atkārtojiet izdalīšanas procedūru ar jauniem paraugiem. |

Komentāri un ieteikumi

- | | | |
|----|--|--|
| j) | Bufēršķīdums Buffer ACW1 vai Buffer ACW2 sagatavots ar 70% etanolu | Pārbaudiet, vai buferšķīdumu Buffer ACW1 un Buffer ACW2 koncentrāti ir atšķaidīti ar 96–100% etanolu (skatiet 26. lpp.). Atkārtojiet izdalīšanas procedūru ar jauniem paraugiem. |
|----|--|--|

DNS vai RNS labi nereaģē pakārtotās fermentatīvās reakcijās

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Eluāta ir maz vai nav DNS | Iespējamus iemeslus skatiet iepriekš sadaļā "Eluāta ir ļoti maz vai nav nukleīnskābju". Ja iespējams, palieliniet reakcijai pievienotā eluāta tilpumu. |
| b) | Izmantots nepiemērots eluēšanas tilpums | Nosakiet pakārtotajam lietojumam piemēroto eluāta maksimālo tilpumu. Samaziniet vai palieliniet pievienotā eluāta tilpumu atbilstoši pakārtotajam lietojumam. Eluēšanas tilpumu var pielāgot proporcionāli.
Piezīme. Eluēšana ar mazākiem Buffer AVE tilpumiem var nodrošināt augstāku nukleīnskābes koncentrāciju, bet var samazināties kopējais iegūtais daudzums. |
| c) | Bufēršķīdumi nav rūpīgi samaisīti | Skalošanas buferšķīduma Buffer ACW2 sāls un etanola komponenti var būt atdalījušies, ja buferšķīdums starp sērijām ir pārāk ilgi stāvējis. Pirms katras sērijas vienmēr rūpīgi samaisiet buferšķīdumus. |
| d) | Traucējumi RNS nesējvides dēļ | Ja RNS nesējvides klātbūtnē eluātā rada pakārtotās fermentācijas reakcijas traucējumus, var būt nepieciešams samazināt RNS nesējvides daudzumu vai pilnībā atteikties no tās. |

Vispārējā rīkošanās

- | | | |
|----|----------------------------------|---|
| a) | Nosprostots QIAamp Mini stobriņš | Ja plūsmas ātrums ir samazināts, var palielināt vakuuma laiku. Alternatīva iespēja ir aizvērt vārstu VacValve, ja tas tiek izmantots, un uzmanīgi izņemt stobriņa paplašinātāja–VacConnector–VacValve bloku no QIAamp Mini stobriņa, nekādā apmērā nezaudējot lizātu stobriņa paplašinātājā.
Izņemiet QIAamp Mini stobriņu no vakuuma kolektora, ievietojiet to 2 ml skalošanas stobriņā un centrifugējiet pilnā ātrumā, līdz paraugs ir pilnībā šķērsojis membrānu. Nomainiet stobriņa paplašinātāja–VacConnector–VacValve bloku, kurā atrodas atlikušais lizāts. Ieslēdziet vakuuma sūkni, atveriet vārstu VacValve un turpiniet atlikušā lizāta ielādi.
Ja QIAamp Mini Column joprojām nosprostojas, atkārtojiet iepriekš aprakstīto procedūru.
Atkārtotas sasaldēšanas un atkausēšanas dēļ plazmā, iespējams, ir izveidojušies krioprecipitāti. Tie var nosprostot QIAamp Mini stobriņu. Neizmantojiet plazmu, kas sasaldēta un atkausēta vairāk nekā vienu reizi.
Ja ir redzami krioprecipitāti, dzidriniet paraugu, centrifugējot 5 min ar ātrumu 16 000 x g. |
| b) | Mainīgi eluēšanas tilpumi | Dažādi paraugi var ietekmēt gala eluāta tilpumu. Atgūtais eluāta tilpums var būt par 5 µl mazāks nekā eluēšanas tilpums, kas pielietots QIAamp Mini stobriņam. |

Komentāri un ieteikumi

- c) Nav sasniegts vakuuma spiediens no –800 līdz –900 mbar

Vakuuma kolektors nav cieši aizvērts. Kad vakuums ir ieslēgts, piespiediet vakuuma kolektora vāku. Pārbaudiet, vai ir sasniegts vakuuma spiediens.

Ir nolietojusies QIAvac vāka blīve. Vizuāli pārbaudiet kolektora blīvi un, ja nepieciešams, nomainiet.











Nolietojušies vārsti VacValves. Izņemiet visus vārstus VacValves un ievietojiet savienotājus VacConnectors tieši Luer tipa paplašinātājos. Ievietojiet QIAamp Mini stobriņus savienotājos VacConnectors, aizveriet stobriņu vāku un ieslēdziet vakuumu. Pārbaudiet, vai ir sasniegts vakuuma spiediens. Ja nepieciešams, nomainiet vārstus VacValves.

Savienojumā ar vakuuma sūkni ir sūce. Aizveriet visus Luer tipa paplašinātājus ar Luer tipa vāciņiem un ieslēdziet vakuuma sūkni. Kad sūknis ir ieslēgts, pārbaudiet, vai vakuuma spiediens ir stabils (un vai ierīces Vacuum Regulator vārsts ir aizvērts). Ja nepieciešams, nomainiet savienojumus starp sūkni un vakuuma kolektoru.

Ja vakuuma spiediens joprojām nav sasniegts, nomainiet vakuuma sūkni pret spēcīgāku.



Simboli

Lietošanas instrukcijās vai uz iepakojuma un marķējuma var būt redzami tālāk norādītie simboli.

Simbols	Simbola definīcija
 Σ <N>	Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> reakcijām
	Izlietot līdz
	Šis produkts atbilst prasībām, ko nosaka Eiropas Regula 2017/746 par in vitro diagnostikas medicīniskajām ierīcēm.
	In vitro diagnostikas medicīnas ierīce
	Kataloga numurs
	Partijas numurs
	Materiāla numurs (t.i., komponenta marķējums)
	Komponenti
	Satur
	Numurs

Simbols

Simbola definīcija

	Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs
Rn	R apzīmē lietošanas instrukcijas redakciju, bet n ir redakcijas numurs
	Temperatūras ierobežojums
	Ražotājs
	Skatīt lietošanas instrukcijas
	Sargāt no saules gaismas
	Brīdinājums/uzmanību!
	Saņemot
	Atvērt pēc piegādes; uzglabāt QIAamp Mini Spin stobriņus 2–8 °C temperatūrā
	Tilpums
	Jāpievieno

Simbols

Simbola definīcija



Pēc etanola pievienošanas pudeles saturam pierakstiet pašreizējo datumu

EtOH

Etanols



Pēc izopropanola pievienošanas pudeles saturam pierakstiet pašreizējo datumu

IPA

Izopropanols

→

Izraisa

GITC

Guanidīna tiocianāts

GuHCl

Guanidīna hidrohlorīds

BRIJ 58

BRIJ 58

PROTK

Proteināze K

UDI

Ierīces unikālais identifikators

Pielikums A. Ieteikums asins plazmas atdalīšanai un uzglabāšanai

Lai stabilizētu asins parauga ņemšanas stobriņus (piem., PAXgene ccfDNA Tube vai Streck Cell-Free DNA Tube), lūdzu, ievērojiet ražotāja sniegtās instrukcijas attiecībā uz plazmas atdalīšanu un uzglabāšanu. Ieteicams pārbaudīt šos uzglabāšanas apstākļus kombinācijā ar jūsu konkrēto pakārtoto lietojumu un mērķi.

Nestabilizētu BCT gadījumā mēs iesakām ievērot standartu ISO 20186-3:2019 Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood — Part 3: Isolated circulating cell free DNA from plasma vai standartu CEN/TS 17742 Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood — Isolated circulating cell free RNA from plasma.

Lai izolētu cirkulējošās, šūnas nesaturošās nukleīnskābes no asins paraugiem, mēs iesakām ievērot šo protokolu, kurā ietilpst liela gravitācijas spēka centrifugēšanas posms, lai atdalītu šūnu atliekas, tādējādi samazinot šūnu vai genomiskās DNS un RNS daudzumu paraugā.

1. Ievietojiet EDTA pilnasinis BD Vacutainer® stobriņos (vai citos primārajos asins stobriņos, kas satur EDTA kā antikoagulantu) centrifūgā, kas atdzesēta līdz 4 °C un aprīkota ar svārstīgo rotoru un kausiem.
2. Centrifugējiet asins paraugus 10 min ar ātrumu 1900 x g (3000 apgr./min) 4 °C temperatūrā.
3. Uzmanīgi aspirējiet plazmas virsslāni, neaizskarot plazmas– šūnu saskares slāni. No viena 10 ml primārā asins stobriņa var iegūt aptuveni 4–5 ml plazmas.

Piezīme. Šajā stadijā plazmu var izmantot cirkulējošo nukleīnskābju ekstrakcijai. Tomēr nākamā liela ātruma centrifugēšana atdalīs papildu šūnu atliekas un cirkulējošo nukleīnskābju piesārņojumu ar genoma DNS un RNS, kas iegūti no bojātām kodolotām asins šūnām.

4. Aspirētā plazma tiek pārnesta uz svaigu centrifūgas stobriņu.
5. Centrifugējiet plazmas paraugus 10 min ar ātrumu 16 000 x g (fiksēta leņķa rotorā) 4 °C temperatūrā.
Tā tiks atdalītas papildu šūnu nukleīnskābes, kas piestiprinātas šūnu atlikumiem.
6. Uzmanīgi noņemiet virsslāni un pārnesiet jaunā stobriņā, nepieskaroties granulām.
7. Ja plazma tiks izmantota nukleīnskābju ekstrakcijai tajā pašā dienā, uzglabājiet 2–8 °C temperatūrā līdz turpmākai apstrādei. Ilgākas uzglabāšanas gadījumā plazmas alikvotās daļas no stabilizētiem vai nestabilizētiem asins ņemšanas stobriņiem var uzglabāt –20 °C temperatūrā (ja mērķis ir DNS) vai –80 °C temperatūrā (ja mērķis ir RNS) vismaz 4 nedēļas. Pirms plazmas izmantošanas nukleīnskābju ekstrakcijai atkausējiet plazmas stobriņus istabas temperatūrā.
8. **Papildiespēja.** Lai noņemtu krioprecipitātus, centrifugējiet plazmas paraugus 5 min ar ātrumu 16 000 x g (fiksēta leņķa rotorā).

Papildiespēja. Pārnesiet virsslāni jaunā stobriņā un tad sāciet cirkulējošo nukleīnskābju ekstrakcijas protokola izpildi.

B pielikums. Vispārīgas piezīmes par RNS apstrādi

RNS apstrāde

Ribonukleāzes (RNāzes) ir ļoti stabili un aktīvi enzīmi, kuru darbībai parasti nav nepieciešami kofaktori. RNāzes ir grūti inaktivējamas, un pat ar nelielu daudzumu pietiek, lai noārdītu RNS, tāpēc nedrīkst izmantot plastmasas vai stikla piederumus, iepriekš nenovēršot iespējamo kontamināciju ar RNāzi. Jārīkojas ļoti uzmanīgi, lai RNāzes nejauši nenokļūtu RNS paraugā izdalīšanas procedūras laikā vai pēc tās. Lai izveidotu un uzturētu vidi bez RNāzēm, strādājot ar RNS, priekšapstrādes laikā un vienreizlietojamu un vairākkārt lietojamu trauku un šķīdumu lietošanas laikā ir jāievēro tālāk norādītie piesardzības pasākumi.

Vispārējā rīkošanās

Strādājot ar RNS, vienmēr jāizmanto atbilstoši mikrobioloģiski, aseptiski paņēmieni. Uz rokām un putekļu daļiņām var būt baktērijas un pelējuma sēnītes, kas ir visbiežāk sastopamie kontaminācijas ar RNāzi avoti. Strādājot ar reaģentiem un RNS paraugiem, vienmēr valkājiet lateksa vai vinila cimdus, lai novērstu kontamināciju ar RNāzi no ādas virsmas vai putekļaina laboratorijas aprīkojuma. Bieži mainiet cimdus un, kad vien iespējams, turiet stobriņus noslēgtus. Kad alikvotās daļas tiek pipetētas pakārtotiem lietojumiem, turiet atfīrto RNS uz ledus.

Vienreizlietojami plastmasas piederumi

Visas procedūras laikā ieteicams lietot sterilus, vienreizlietojamus polipropilēna piederumus bez RNāzes.

Informācija par pasūtīšanu

Produkts	Saturs	Kat. nr.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	50 paraugu sagatavošanai: QIAamp Mini stobriņi, stobriņu paplašinātāji, savienotāji VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reaģenti, buferšķīdumi un paraugu ņemšanas stobriņi	61504
Piederumi		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vakuuma kolektors 1–24 centrifūgas stobriņu apstrādei: QIAvac 24 Plus vacuum manifold, Luer tipa spraudņi un ātrie savienotāji	19413
Vacuum Pump*	Universāls vakuuma sūknis	84010 [ASV un Kanāda] 84000 [Japāna] 84020 [pārējās valstis]
QIAvac Connecting System*	Sistēma vakuuma kolektora savienošanai ar vakuuma sūkni: ietilpst paplāte, atkritumu pudeles, caurulītes, savienojumi, vārsti, mērierīce un 24 vārsti VacValves	19419

* Lietošanai ar vakuuma protokoliem.

Jaunāko informāciju par licencēšanu un produktu juridiskās atrunas skatiet attiecīgā QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja instrukcijā. QIAGEN komplektu rokasgrāmatas un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnē www.qiagen.com, un tās var pieprasīt arī no QIAGEN tehniskā atbalsta dienesta vai vietējiem preču izplatītājiem.

Dokumenta redakciju vēsture

Redakcija

Apraksts

R1, 2022. gada jūnijs

IVDR Kit versijas 2 izlaišana, nav izmaiņu protokolos vai veikspējas datos, salīdzinot ar komplekta versiju 1; paredzētajā lietojumā pievienots vārds “manuālai” izolēšanai; nelieli atjauninājumi un korekcijas

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

Ierobežotās licences līgums komplektam QIAamp DSP Circulating NA Kit

Šī produkta izmantošana liecina par katra produkta pircēja vai lietotāja piekrišanu tālāk minētajiem nosacījumiem.

1. Šo produktu drīkst lietot tikai saskaņā ar kopā ar produktu nodrošinātajiem protokoliem un šo rokasgrāmatu un tikai kopā ar sastāvdaļām, kas ietilpst šajā komplektā. Uzņēmums QIAGEN nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā ietvertās sastāvdaļas izmantotu kopā ar jebkādām sastāvdaļām, kas neietilpst šajā komplektā, vai ar tām apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti kopā ar produktu piegādātajos protokolos un šajā rokasgrāmatā, kā arī papildu protokolos, kas pieejami tīmekļa vietnē www.qiagen.com. Dažus no šiem papildu protokoliem QIAGEN lietotāji nodrošina QIAGEN lietotājiem. Šie protokoli nav rūpīgi testēti vai optimizēti uzņēmumā QIAGEN. Uzņēmums QIAGEN nedz apliecina, nedz garantē, ka tie nepārkāpj trešo personu tiesības.
2. Uzņēmums QIAGEN nesniedz citas garantijas, izņemot skaidri norādītās licences, ka šis panelis un/vai tā lietošana neaizskar trešo personu tiesības.
3. Šis panelis un tā komponenti ir licencēti vienreizējai lietošanai, un tos nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.
4. Uzņēmums QIAGEN īpaši atsakās no jebkādām citām tiesām vai netiesām licencēm, kas nav skaidri norādīta.
5. Paneļa pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt nekādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām. Uzņēmums QIAGEN var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un apņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šo ierobežoto licences līgumu vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar paneli un/vai tā komponentiem.

Jaunākos licences nosacījumus skatiet tīmekļa vietnē www.qiagen.com.

Preču zīmes: QIAGEN®. Sample to Insight®, QIAamp®, (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); PAXgene® (PreAnalytix GmbH); Tween™ (ICI Americas Inc.). Šajā dokumentā minētie reģistrētie nosaukumi, preču zīmes u. c. ir uzskatāmi par aizsargātiem ar likumu arī tad, ja tas nav īpaši norādīts.

Jun-2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN, visas tiesības paturētas.

Pasūtīšana www.qiagen.com/shop | Tehniskais atbalsts support.qiagen.com |
Tīmekļa vietne www.qiagen.com